

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-92494

(43) 公開日 平成11年(1999) 4月6日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 0 7 H 21/04

C 0 7 H 21/04

B

C 1 2 N 15/09

C 1 2 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数30 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-256795

(22) 出願日 平成9年(1997) 9月22日

(71) 出願人 000006792

理化学研究所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

(72) 発明者 林崎 良英

茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番 1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内

(72) 発明者 ビエロ カルニンチ

茨城県つくば市高野台 3 丁目 1 番 1 理化学研究所ライフサイエンス筑波研究センター内

(74) 代理人 弁理士 塩澤 寿夫 (外 2 名)

(54) 【発明の名称】 DNAの単離方法

(57) 【要約】

【課題】生体試料を前処理することなく、かつDNAの収率も高い精製されたDNAを回収する方法を提供すること。

【解決手段】(A) メンブレンフィルター上にDNA結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及びDNAを含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていたDNAをDNA結合性担体に結合させ、

(B) 溶解溶液を吸引によりカラムから除去してDNAを結合した担体を他の成分から分離し、(C) カラムにDNA解離溶液を供給して、担体からDNAを解離させ、及び(D) 解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離したDNAを含む溶液を収集する、DNA単離方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度がDNAの沈殿を阻害し始める濃度（以下、沈殿阻害開始濃度という）以上である溶解溶液を、DNA結合性担体と接触させて、前記試料中のDNAを前記DNA結合性担体に結合させる工程、

(b) DNAを結合した担体を他の成分から分離する工程、

(c) 分離した担体から結合したDNAを解離させる工程、及び

(d) 解離したDNAを収集する工程を含む、生体試料中に含まれるDNAを単離する方法。

【請求項 2】 溶解溶液の塩濃度が、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下である請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】 生体試料が血液、細胞又は生体組織である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】 カチオン界面活性剤がセチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤である請求項 1～3 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 5】 生体試料が少なくとも2本鎖直鎖DNA及び1本鎖直鎖DNAを含有し、かつ工程 (a) において、2本鎖直鎖DNA をDNA結合性担体に選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖DNAを選択的に単離する請求項 1～4 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6】 溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いる請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 水素結合切断剤が尿素またはホルムアルデヒドである請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 DNA結合性担体が、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、セライト、セルロース、及び珪藻土からなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズ、繊維または粉末である請求項 1～7 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 9】 少なくとも工程 (a) を非加温下で行う請求項 1～8 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 10】 工程 (b) において、DNAを結合した担体を濾過または遠心分離し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNAを結合した担体を他の成分から分離する請求項 1～9 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 11】 洗浄溶液が、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】 担体をカチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次洗浄する請求項 10 または 11 に記載の方法。

【請求項 13】 工程 (c) において、分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させる請求項 1～12 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 14】 洗浄溶液及び／又は溶解溶液がグリセロールを含有する請求項 10～13 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 15】 工程 (d) において、解離したDNAを含む溶液と担体との混合物を固液分離することにより、解離したDNAを溶液として回収する請求項 1～14 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 16】 (A) 溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上にDNA結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及びDNAを含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていたDNAをDNA結合性担体に結合させる工程、

(B) 溶解溶液を吸引によりカラムから除去してDNAを結合した担体を他の成分から分離する工程、

(C) カラムにDNA解離溶液を供給して、担体からDNAを解離させる工程、及び

(D) 解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離したDNAを含む溶液を収集する工程を含む、生体試料中に含まれるDNAを単離する方法。

【請求項 17】 溶解溶液の塩濃度が、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下である請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】 生体試料が血液、細胞又は生体組織である請求項 16 または 17 に記載の方法。

【請求項 19】 カチオン界面活性剤がセチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤である請求項 16～18 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】 生体試料が少なくとも2本鎖直鎖DNA及び1本鎖直鎖DNAを含有し、かつ工程 (A) において、2本鎖直鎖DNA をDNA結合性担体に選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖DNAを選択的に単離する請求項 16～19 のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】 溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いる請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】 水素結合切断剤が尿素またはホルムアルデヒドである請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】 DNA結合性担体が、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト、セライト、セルロース、及び珪藻土からなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズ、繊維または粉末である請求項 16～22 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 24】 少なくとも工程 (A) を非加温下で行う請求項 16～23 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 25】 工程 (B) において、DNA を結合した担体を濾過し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNA を結合した担体を他の成分から分離する請求項 16～24 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 26】 洗浄溶液が、沈殿阻害開始濃度の 2 倍の塩濃度または DNA の全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】 担体をカチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次洗浄する請求項 25 または 26 に記載の方法。

【請求項 28】 工程 (C) において用いる解離溶液が、DNA が溶解する組成条件を有する溶解溶液である、請求項 16～27 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 29】 洗浄溶液及び／又は溶解溶液がグリセロールを含有する請求項 25～28 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 30】 複数の DNA を含む試料からの DNA の単離を、基板に設けられた複数のカラムで並行して行う請求項 16～29 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、血液、細胞及び生体組織等の生体試料中に含まれる DNA を単離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 遺伝子工学の分野において、大腸菌等の微生物を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、複製増幅した形質転換体から所望のプラスミド DNA を回収することが常時行われている。また、癌等の遺伝子情報を入手して診断に用いる等の目的で、血液、細胞及び生体組織等の生体試料中に含まれる DNA を回収することも行われている。形質転換体からプラスミド DNA をより簡単に回収精製する方法としては、例えば、特開平 4-360686 号公報、特開平 8-23976 号公報、R. Room et al., J. Clin. Microbiol. Vol.28, No.3, p495-503、特開平 7-250681 号公報に記載の方法がある。

【0003】 中でも、前記 R. Room et al., J. Clin. Microbiol. Vol.28, No.3, p495-503 に記載されたカオ

トロピックイオン法は、DNA 吸着性の担体とカオトロピックな溶液とを併用して、微生物中に含まれる RNA と DNA とを分離して、DNA のみを単離できる優れた方法である。前記特開平 7-250681 号公報は、この方法を利用し、2 種類のカートリッジを用いて微生物菌体から DNA のみを精製する方法を開示する。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 ところが、上記カオトロピックイオン法を用いた場合、微生物が対象である場合とは異なり、血液、細胞及び生体組織等の生体試料が対象である場合、これら生体試料中に含まれる DNA を生体試料を前処理等することなしに単離することができなかった。例えば、血液に含まれる DNA を単離する場合、上記カオトロピックイオン法ではタンパク質も担体に捕捉してしまうため、DNA を単離回収できない。

【0005】 そこで、上記生体試料から DNA を単離するためのカオトロピックイオン法以外の方法として、カチオン界面活性剤を用いる方法が知られている。例えば、0.5～0.6 M の塩化ナトリウムとカチオン界面活性剤としてアルキルベンジルジメチルアンモニウム塩の存在下で血液に含まれる DNA を沈殿させる方法 [米国特許 5,010,183 号] が知られている。しかし、上記の方法は、血液を前処理 (分離) 等することなしにそのまま試料として使用して DNA を回収することができず、例えば血液から白血球を分離する等の前処理を必要とする。また、DNA の収率や純度も決して高いものではなかった。

【0006】 そこで本発明の目的は、生体試料を前処理することなくそのまま使用することができ、かつ DNA の収率も高い精製された DNA を回収する方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、生体試料を前処理することなくそのまま使用することができ、かつ DNA の収率も高い精製された DNA を回収する方法であって、オートメーション化が可能なように、遠心分離や抽出等の煩雑な操作も不要であり、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により行える方法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明は、(a) DNA を含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度が DNA の沈殿を阻害し始める濃度 (以下、沈殿阻害開始濃度という) 以上である溶解溶液を、DNA 結合性担体と接触させて、前記試料中の DNA を前記 DNA 結合性担体に結合させる工程、(b) DNA を結合した担体を他の成分から分離する工程、(c) 分離した担体から結合した DNA を解離させる工程、及び (d) 解離した DNA を収集する工程を含む、生体試料中に含まれる DNA を単離する方法 (第 1 の方法) に関する。

【0008】 さらに本発明は、(A) 溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上

にDNA結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及びDNAを含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていたDNAをDNA結合性担体に結合させる工程、(B)溶解溶液を吸引によりカラムから除去してDNAを結合した担体を他の成分から分離する工程、(C)カラムにDNA解離溶液を供給して、担体からDNAを解離させる工程、及び(D)解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離したDNAを含む溶液を収集する工程を含む、生体試料中に含まれるDNAを単離する方法(第2の方法)に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】

DNA単離方法(第1の方法)

工程(a)では、DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有し、かつ前記塩の濃度がDNAの沈殿阻害開始濃度以上である溶解溶液を、DNA結合性担体と接触させて、前記試料中のDNAを前記DNA結合性担体に結合させる。DNA結合性担体と接触のインキュベーション時間は、溶解溶液の組成及び量、並びにDNA結合性担体の種類と量により適宜決定できるが、通常、3～5分程度で十分である。また、インキュベーションは非加温で行うことができ、必要により、適宜加熱することもできるが、含まれるDNAが変性する条件は避けることが好ましい。

【0010】DNAを含む生体試料は、例えば、血液、細胞又は生体組織であることができる。細胞は、真核生物細胞又は細菌細胞であることができる。血液は扱いが難しい生体試料であり、従来方法ではDNAの単離が困難であったが、本発明の方法では、DNAを単離することができる。溶解溶液中のDNAを含む生体試料の濃度は、生体試料の種類、溶解溶液の組成、及びDNA結合性担体の種類に応じて適宜決定できる。

【0011】カチオン界面活性剤としては、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤を挙げることができる。しかし、これらの界面活性剤に限定されるものではない。また、カチオン界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度を考慮して決定され、通常0.01～10%の範囲である。

【0012】塩は、無機酸塩(例えば、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、リン酸塩等)または有機酸塩(例えば、酢酸塩、クエン酸塩等)であることができる。より具体的には、NaClやその他の塩(例えば、Cl、Br、酢酸、蟻酸と組み合わせた場合のNa、K、Liによる全ての塩)を挙げることができる。

【0013】工程(a)では、DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有する溶液の塩濃度をDNAの沈

殿阻害開始濃度以上とする。これにより、溶液に含まれるDNAを選択的に、DNA結合性担体に結合させることができる。沈殿阻害開始濃度は、溶液に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、沈殿阻害開始濃度は約0.6Mである。

【0014】また、塩濃度は、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下であることが、溶液に含まれるDNAのDNA結合性担体への結合効率を考慮すると好ましい。DNAの全量が溶解する塩濃度も、沈殿阻害開始濃度と同様に、溶液に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、DNAの全量が溶解する塩濃度は約0.8である。

【0015】生体試料が少なくとも2本鎖直鎖DNA及び1本鎖直鎖DNAを含有する場合、工程(a)において、2本鎖直鎖DNAをDNA結合性担体を選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖DNAを選択的に単離することもできる。この場合、溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いることが好ましい。水素結合切断剤としては、例えば、尿素及びホルムアルデヒドを挙げることができる。尿素的濃度は、例えば、10% (w/v)以上であることができる。DNA結合性担体としては、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト及びセライトからなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末を挙げることができる。

【0016】工程(b)においては、DNAを結合した担体を濾過または遠心分離し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNAを結合した担体を他の成分から分離する。洗浄溶液が、好ましくは、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する。また、担体の洗浄は、カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次行うことが好ましい。カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体から不純物を除去し、ついて揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体からカチオン界面活性剤を除去することができる。尚、上記揮発性有機溶媒は、担体に結合したDNAを変性させることがなく、かつ洗浄後速やかに揮発する点からエタノールであることが好ましい。洗浄後、必要により、担体を乾燥することができるが、過度の乾燥は、担体に結合したDNAの解離を妨げる場合がある。

【0017】上記洗浄溶液及び／又は溶解溶液は、DNA結合性担体同士が吸着して取り扱いが困難になることを回避するという観点からグリセロールを含有する溶液であることが好ましい。グリセロールの添加量は、例えば、1～50%の範囲とすることができる。

【0018】工程(c)において、分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させる。DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液は、例えば、水又は加熱水であることができ、加熱水の温度は、DNAが溶解しやすい温度を適宜選択できる。

【0019】工程(d)において、解離したDNAを含む溶液と担体との混合物を固液分離することにより、解離したDNAを溶液として回収する。固液分離は、例えば、遠心分離や濾過であることができる。

【0020】DNA単離方法(第2の方法)

工程(A)では、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上にDNA結合性担体を設けたカラムに、塩、カチオン界面活性剤及びDNAを含む生体試料を含み、かつ前記塩の濃度が沈殿阻害開始濃度以上である溶液を供給して、前記生体試料中に含まれていたDNAをDNA結合性担体に結合させる。

【0021】本発明の第2の方法は、DNA結合性担体を溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するメンブレンフィルター上に設けたカラムを用いること以外は、実質的に、第1の方法と共通する部分が多い。

【0022】上記カラムは、単独のパイプ(管)の一方の開口にメンブレンフィルターを設けたものであっても、あるいは、一定の厚みを有する基板に複数の貫通孔が設けられ、それら貫通孔の一方の開口にメンブレンフィルターを設けた物であってもよい。後者の場合、複数のDNAを含む試料からのDNAの単離を、基板に設けられた複数のカラムで並行して行うことができ、多種類のサンプルの処理を迅速に行うことができるという利点がある。

【0023】DNA結合性担体としては、ガラス、シリカゲル、アニオン交換樹脂、ハイドロキシアパタイト及びセライトからなる群から選ばれる材料からなる、メッシュフィルター、ビーズまたは粉末を挙げることができる。

【0024】また、メンブレンフィルターは、溶液保持能力と吸引時に溶液透過能力とを有するものである。即ち、非吸引時には、メンブレンフィルター上に溶液が保持され、溶液を保持する側とは反対側から吸引することで、保持された溶液がメンブレンフィルターを介して排出される性能を有するものである。このようなメンブレンフィルターを用いることで、DNA結合性担体とDNAを含む溶液とのインキュベーション時間、溶液の排出、さらには洗浄等を制御しながら行うことができるという利点がある。特に、固液分離に遠心分離を必要としないの

で、方法を自動化しやすいという利点もある。

【0025】DNA結合性担体と接触のインキュベーション時間は、溶解溶液の組成及び量、並びにDNA結合性担体の種類と量により適宜決定できるが、通常、3～5分程度で十分である。また、インキュベーションは非加熱で行うことができ、必要により、適宜加熱することもできるが、含まれるDNAが変性する条件は避けることが好ましい。

【0026】DNAを含む生体試料は、例えば、血液、細胞又は生体組織であることができる。細胞は、真核生物細胞又は細菌細胞であることができる。血液は扱いが難しい生体試料であり、従来方法ではDNAの単離が困難であったが、本発明の方法では、DNAを単離することができる。溶解溶液中のDNAを含む生体試料の濃度は、生体試料の種類、溶解溶液の組成、及びDNA結合性担体の種類に応じて適宜決定できる。

【0027】カチオン界面活性剤としては、例えば、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、及びセチルピリジニウムブロミドからなる群から選ばれる1種または2種以上の界面活性剤を挙げることができる。しかし、これらの界面活性剤に限定されるものではない。また、カチオン界面活性剤の濃度は、臨界ミセル濃度を考慮して決定され、通常0.01～10%の範囲である。

【0028】塩は、無機酸塩(例えば、塩化物、硝酸塩、硫酸塩、磷酸塩等)または有機酸塩(例えば、酢酸塩、クエン酸塩等)であることができる。

【0029】工程(A)では、DNAを含む生体試料、塩及びカチオン界面活性剤を含有する溶液の塩濃度をDNAの沈殿阻害開始濃度以上とする。これにより、溶液中に含まれるDNAを選択的に、DNA結合性担体に結合させることができる。沈殿阻害開始濃度は、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、沈殿阻害開始濃度は約0.6Mである。

【0030】また、塩濃度は、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下であることが、溶液中に含まれるDNAのDNA結合性担体への結合効率を考慮すると好ましい。DNAの全量が溶解する塩濃度も、沈殿阻害開始濃度と同様に、溶液中に含まれる塩の種類により異なり、また、同一の塩であっても、その他の含有成分の種類と濃度によっても変化し、各塩について、適宜決定することができる。例えば、塩化ナトリウムの場合、後述するように、DNAの全量が溶解する塩濃度は約0.8である。

【0031】生体試料が少なくとも2本鎖直鎖DNA及び1本鎖直鎖DNAを含有する場合、工程(A)において、

2本鎖直鎖DNAをDNA結合性担体を選択的に結合させて、生体試料中に含まれる2本鎖直鎖DNAを選択的に単離することもできる。この場合、溶解溶液としてさらに水素結合切断剤を含む溶液を用いることが好ましい。水素結合切断剤としては、例えば、尿素及びホルムアルデヒドを挙げることができる。尿素的濃度は、例えば、10% (w/v)以上であることができる。

【0032】工程(B)で、溶解溶液をしてDNAを結合した担体を他の成分から分離する。特に、DNAを結合した担体をメンブレンフィルターを介して、吸引濾過によりカラムから除去し、得られる担体を沈殿阻害開始濃度以上の塩濃度を有する洗浄溶液で洗浄することにより、DNAを結合した担体を他の成分から分離する。洗浄溶液が、好ましくは、沈殿阻害開始濃度の2倍の塩濃度またはDNAの全量が溶解する塩濃度のいずれか高い濃度以下の塩濃度を有する。また、担体の洗浄は、カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液及び揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液で順次行うことが好ましい。カチオン界面活性剤を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体から不純物を除去し、ついで揮発性有機溶媒を含有する水溶液からなる洗浄溶液を用いることで、担体からカチオン界面活性剤を除去することができる。尚、上記揮発性有機溶媒は、担体に結合したDNAを変性させることがなく、かつ洗浄後速やかに揮発するという観点からエタノールであることが好ましい。洗浄後、必要により、担体を乾燥することができるが、過度の乾燥は、担体に結合したDNAの解離を妨げる場合がある。

【0033】上記洗浄溶液及び／又は溶解溶液は、DNA結合性担体同士が吸着して取り扱いが困難になることを回避するという観点からグリセロールを含有する溶液であることが好ましい。グリセロールの添加量は、例えば、1～50%の範囲とすることができる。

【0034】工程(C)においては、カラムにDNA解離溶液を供給して、担体からDNAを解離させる。分離した担体を、DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液と混合することにより、結合したDNAを担体から解離させることができる。DNAが溶解する組成条件を有する溶解溶液は、例えば、水又は加熱水であることができ、加熱水の温度は、DNAが溶解しやすい温度を適宜選択できる。

【0035】工程(D)においては、解離溶液を吸引によりカラムから分離して解離したDNAを含む溶液を収集する。本発明の第2の方法は、溶液と担体との分離を吸引濾過によりおこなうことができるため、自動化し易いという利点がある。

【0036】

【実施例】以下本発明を実施例によりさらに説明する。

参考例(沈殿阻害開始濃度の測定)

溶液組成

0～1.5M NaCl

30mM Tris (pH8.5)

15mM EDTA

0.5% CTAB(セチルトリメチルアンモニウムブロミド)

ゲノミックDNA 50μg/ml

【0037】NaCl濃度を0～1.5Mの間で0.05M毎に調製した上記組成の溶液をそれぞれ作成し、沈殿ができる様子を調べた。その後、遠心して上清を捨て、沈殿物を再度水に溶解して、DNAの量を調べるため、260nmの吸光度を測定した。その結果を図1に示す。沈殿が始まる濃度を沈殿開始濃度とし、沈殿量が一定となる濃度をこの溶液の沈殿阻害開始濃度とした。この溶液の沈殿開始濃度は0.7Mであり、沈殿阻害開始濃度は0.9Mであった。

【0038】実施例1

1) 300マイクロリットル(エッペンドルフ試験管サイズのマイクロフィルター用)の全血に750マイクロリットルの下記組成を有する溶解溶液(ソリューションA)を加える。

溶解溶液(ソリューションA):

20 尿素 25% (w/v),

CTAB (セチルトリメチルアンモニウムブロミド) 0.45 %

NaCl 0.8 M,

EDTA 15 mM,

Tris pH 7.1, 80 mM,

グリセロール 10% (v/v),

珪藻土(シグマ試薬、酸洗浄の後に焼成したもの) 1% (w/v),

セルロース(シグマ社、アルファ・セルロース) 0.3%

30 グリセロールはシリカマトリックスの操作を容易にし、その目詰まりを防ぐという利点がある。

【0039】この溶液はDNA結合性マトリックスを含んでおり、使用前にマグネチックスターラーで攪拌する。DNA結合性マトリックスは、DNA結合性マトリックスそのものの再懸濁を容易にしそれにより抽出の再現性を高めるために不活性マトリックスと合わせて溶解してある。溶解溶液を添加したのち、反転又は弱い攪拌により完全に混合する。溶解反応は室温又は穏やかな加熱下、すなわち37℃で行うことができる。インキュベーション時間は5

40

分間とした。
【0040】2) 上記混合液を適当なフィルターに移し、減圧にかける。溶解反応液全体をフィルターに移すことで処理を単純化することができる。最終的に混入物質は洗い出されDNAがDNA結合性マトリックス上に保持される。

【0041】3) 上記フィルターに900マイクロリットルの下記に組成を示す洗浄用溶液Aを加える。900マイクロリットルの洗浄用溶液Aをフィルター漏斗に満たしそれによってフィルター全体を完全に洗浄するのに十分な容量である。減圧を加えて溶液を除去する。この工程

50

によりフィルター中に存在する残存混入物を除去する。任意でこの工程を繰り返すことができる。これにより処理の再現性をあげることができる。

洗浄液A:

尿素 25%

CTAB 0.45%

NaCl 0.55 M

EDTA 15 mM

Tris pH 7.1 80 mM

グリセロール 10% (v/v)

【0042】4) 液相が除去されたら、フィルターに900マイクロリットルの洗浄用溶液Bを加える。このアルコール性食塩水によりフィルター及びDNA結合樹脂からカチオン洗剤を除去することができる。この溶液を加えた後、減圧にかけける前にイオン交換が完全になされるように数分間(2-4分間)インキュベートすることが望ましい。任意でこの工程を繰り返し、処理の再現性を高めることもできる。洗浄液が除去されるまで減圧にかけける。任意で、洗浄用溶液Bに混入している痕跡量の塩を全て除去するためにフィルターをさらに70%エタノールで洗浄してもよい。さらに900マイクロリットルの洗浄用溶液Bを加える。室温で4分間インキュベートする。再び減圧にかけて洗浄液を除去する。

洗浄液B:

トライトンX 100, 0.069%

Tris, 300 mM pH 8.5,

EDTA, 7.5 mM,

NaCl 600 mM

酢酸ナトリウム 600 mM,

グリセロール 30% (v/v)

(この溶液に使用前に2倍容量のエタノールを加えてエタノール最終濃度が66%になるよう調整した。)

【0043】5) サンプルを含有しているフィルターを減圧にかけて通気して、エタノールが除去されるまで3 *

* ないし5分間乾燥させる。(この工程の代わりに遠心工程を行ってもよい)。

6) 50-100マイクロリットルの(予め60又は70℃に加熱した)水をフィルターに加える。このフィルターを遠心管に移す。DNA結合マトリックスが粉碎されるまで(例えば、攪拌して)混合する(これが重要な工程となることがある); 室温で2分間インキュベートし、マイクロ遠心器で30秒間遠心する。単離され再懸濁されたDNAはそのまま使用できる。

10 総時間: 任意の工程を用いるかどうかによって、10ないし25分間であった。

【0044】実施例2

溶解溶液のNaCl濃度を0~1.8Mの間で変えた以外は実施例1と同様にしてDNAを単離した。再懸濁されたDNA水溶液を電気泳動した結果を図2に示す。その結果、NaCl濃度が0.6~1.0Mの範囲でDNAが良好に単離されていることが分かる。0~0.4Mの範囲では、試料中のタンパク質がDNAに混在しており、精製が不十分であることが分かる。また、NaCl濃度が1.2M以上の場合、DNAは回収できなかった。これは、DNAが担体に吸着しなかったためと考えられる。

【0045】

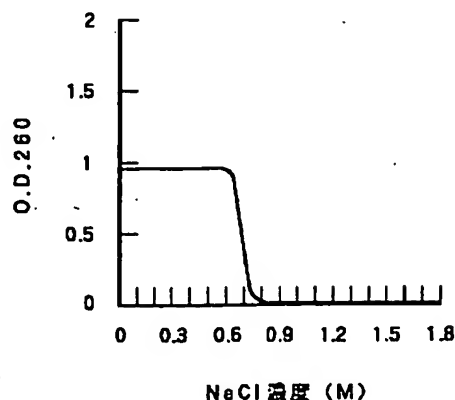
【発明の効果】本発明によれば、生体試料を前処理するところなくそのまま使用することができ、かつDNAの収率も高い精製されたDNAを回収する方法を提供することができる。特に本発明の方法は、オートメーション化が可能のように、必要により、遠心分離や抽出等の煩雑な操作も不要であり、より簡単な構造の器具を使用し、かつより少ない操作により行える方法である。

30 【図面の簡単な説明】

【図1】参考例で得られた塩濃度と260nmの吸光度との関係を示す。

【図2】実施例2で得られた電気泳動の結果を示す。

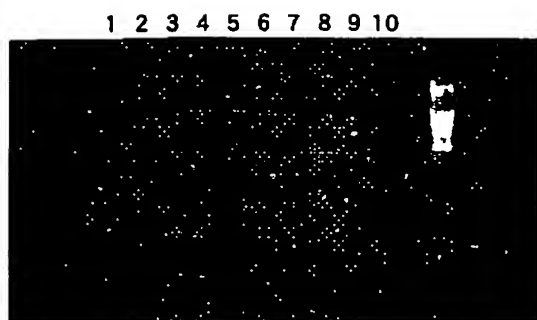
【図1】



(8)

特開平11-92494

【図2】



	NaCl濃度(M)
1	0
2	0.2
3	0.4
4	0.6
5	0.8
6	1.0
7	1.2
8	1.4
9	1.6
10	1.8

BEST AVAILABLE COPY